



TITLE:

# 脳虚血傷害の病態形成における TRPM2チャネルの関与(Digest\_要 約)

AUTHOR(S):

崎元, 伸哉

---

CITATION:

崎元, 伸哉. 脳虚血傷害の病態形成におけるTRPM2チャネルの関与. 京都大学, 2014, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18213>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2018-08-01に公開

# 第一章 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける

## TRPM2 遺伝子欠損の影響

脳梗塞を含む脳血管疾患は先進国の死亡原因の第二位に挙げられ、一命を取り留めても身体障害や言語障害などの重篤な後遺障害を呈することから医療経済学的にも重要な社会問題となっている。特に脳卒中による死亡の半数以上を占める脳梗塞治療法の現状は、組織プラスミノゲン活性化因子の発症 4.5 時間以内の投与という超急性期における血栓溶解療法や脳浮腫軽減を目的とした対処療法などに限られており、脳梗塞に対する有効な神経保護治療薬がほとんど無い。従って、脳梗塞の病態解明と新たな治療標的の探索が強く求められている。近年、脳血管疾患の亜急性期から慢性期にかけて神経細胞が変性する過程では、脳常在性ミクログリアの異常活性化や血液脳関門の破綻によるマクロファージや好中球の浸潤により炎症性サイトカインや細胞障害性因子の産生を介して惹起される過剰な炎症応答が示唆されているが、その機能制御につながる治療標的分子に関する情報が不足している。著者はこれらの免疫細胞に発現が報告されている Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) チャネルに着目した。TRPM2 は活性酸素感受性や温度感受性を有しているポリモーダルな  $\text{Ca}^{2+}$  透過性陽イオンチャネルであり、脳や免疫系の細胞に広く分布していることが知られている。近年、TRPM2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入がミクログリアやマクロファージにおける特定のケモカイン産生を促進し免疫／炎症応答に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。また著者の所属する研究室では、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、TRPM2 がミクログリアおよびマクロファージのサイトカイン産生に関与し、炎症応答を媒介することを報告している。これらの報告より、著者は過剰な炎症応答に伴う神経傷害が生じる脳虚血傷害の病態においても TRPM2 が関わりと想定した。そこで本章では、TRPM2 遺伝子欠損マウス (TRPM2-KO マウス) を用いて、脳梗塞の好発部位である一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを作成し、脳虚血傷害の形成における TRPM2 の関与について研究を行った結果、以下の新知見を得た。

野生型 (WT) および TRPM2-KO マウスを用いて一過性閉塞モデルを作成し比較検討したところ、虚血中および再灌流後の局所脳血流量に変化はなく、血液中の pH、酸素分圧、二酸化炭素分圧などの生理学的パラメータは血糖値を除き変化はなかった。続いて、脳虚血 24、48、72 時間後において、虚血-再灌流により惹起される神経症状を 6 段階の神経学的スコアにて評価したところ、WT マウスでは 24 時間後から 72 時間後にかけて継続した重篤な神経症状が観察され

たが、TRPM2-KO マウスでは 48 時間、72 時間後において有意に低いスコアを示した。さらに、WT マウスでは 24 時間後以降、時間依存的に梗塞巣が増大し、広範な梗塞巣の形成が認められた。TRPM2-KO マウスでは時間依存的な梗塞巣の増大が観察されず、48 時間後および 72 時間後において梗塞巣体積の増大が有意に抑制された。これまでの結果より、TRPM2 は 24 時間以降から 72 時間後という脳虚血の亜急性期において神経障害や梗塞巣の形成に関与することが示唆される。続いて脳虚血 14 日後までの生存率を評価したところ、WT では 4 日後以降に生存率の顕著な低下が観察された。一方、TRPM2-KO マウスでは生存率の低下が有意に改善した。この結果から、TRPM2 遺伝子欠損は虚血-再灌流処置後の長期生存率を増大させることが示唆される。

神経細胞に発現する TRPM2 が脳虚血後の神経細胞死に重要であるという報告や著者の所属する研究室においてラット大脳皮質神経細胞死を用いた検討により過酸化水素誘発の神経細胞死に TRPM2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関与することを報告していることから、著者も神経細胞の TRPM2 が脳虚血傷害の形成に重要であると想定して検討を進めたが、TRPM2-KO マウスを用いて検討した結果、梗塞巣体積は脳虚血 24 時間では差はなく、48 時間および 72 時間後において梗塞巣体積の増大が抑制された。神経細胞に特異的に発現する NMDA 受容体に対する選択的阻害薬投与した際には、脳虚血 24 時間後において有意な寛解作用を示すという報告や神経細胞死惹起につながる神経細胞の虚血周辺部の脱分極は脳虚血 24 時間以内にピークを迎え、神経細胞死につながる神経細胞の過剰興奮は 24 時間以内に起こるという報告を鑑みると、神経細胞に発現する TRPM2 が脳虚血傷害に重要な役割を果たすと仮定した場合、脳虚血 24 時間後の時点において梗塞巣の形成抑制が観察されないという今回の我々の結果は腑に落ちない。脳虚血 24 時間後から 72 時間後という脳虚血の亜急性期には、梗塞巣周囲においてミクログリアの増殖や集積、末梢血からの免疫細胞の浸潤による過剰な炎症応答が惹起され遅発性神経傷害の進展に関与することが示唆されていることから、著者はグリア細胞や免疫細胞に発現する TRPM2 がより脳虚血傷害の形成に重要な因子なのではないかと考えるに至った。しかしながら、神経細胞に発現する TRPM2 が何らかの役割を担っていることを完全に否定することは不可能であるため、神経細胞特異的な TRPM2 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、神経細胞に発現する TRPM2 の脳虚血傷害の寄与について、今後精査していく必要があると考えられる。

以上、本章において著者は、TRPM2 遺伝子欠損マウスを用いて一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを作成し、TRPM2 遺伝子欠損が脳虚血傷害の病態形成に及ぼす影響について検討し、TRPM2 が脳虚血の亜急性期において神経傷害や梗塞巣の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

## 第二章 ミクログリア／マクロファージに発現する

### TRPM2 の脳虚血傷害への関与

第一章において著者は、TRPM2 が脳虚血の亜急性期において神経傷害や梗塞巣の形成に重要な役割を果たしていることを示した。そこで第二章では、TRPM2 遺伝子欠損による脳虚血傷害の保護メカニズムの解明を目指した。

脳虚血再灌流数日後の虚血領域やペナンプラ領域においては、常在性のミクログリア、末梢血より浸潤するマクロファージ、好中球など多種多様な免疫細胞の数が増大することが報告されている。脳虚血後数時間以内に常在性ミクログリアは活性化し炎症性サイトカインを産生する。脳虚血 1 日後にはマクロファージが集積し始め、脳虚血 2、3 日後には浸潤数はピークを迎える。その後、脳虚血 3 日後から 7 日後にかけて好中球や T 細胞、B 細胞、樹状細胞が浸潤数のピークを迎える。近年、これらの細胞が惹起する脳虚血後の過剰な炎症応答が遅発性神経傷害に対して増悪的に働くことが示唆されている。TRPM2 はこれらの免疫細胞やグリア細胞などに幅広く発現しているだけでなく、神経細胞にも発現していることが知られているため、どの細胞に発現する TRPM2 が脳虚血傷害に対して重要な働きをしているのか正確に特定することは困難である。

そこで本章では、脳虚血の亜急性期に浸潤の増大が認められるミクログリア、マクロファージに着目し、浸潤や集積における TRPM2 の関与を免疫組織化学的に検討した。また、薬理学的な細胞選択的阻害薬としてミクログリア／マクロファージの活性化抑制薬ミノサイクリンを、常在性の細胞および骨髄由来細胞を識別する手法として骨髄キメラマウスを用いて、ミクログリアおよびマクロファージに発現する TRPM2 の脳虚血傷害への寄与を検討した。

はじめに、虚血-再灌流処置後の梗塞巣周囲におけるミクログリアおよびマクロファージの集積をミクログリアおよびマクロファージのマーカー Iba1 の免疫組織化学により検出した。WT マウスでは、梗塞巣領域と非梗塞領域の境界部における Iba1 陽性細胞数が 24 時間から 72 時間後にかけて時間依存的に増大したが、TRPM2-KO マウスでは Iba1 陽性細胞数の増大が認められなかった。脳虚血 48 時間後および 72 時間後において、WT マウスと比較して TRPM2-KO マウスでは Iba1 陽性細胞数の増大が有意に抑制された。続いて、虚血-再灌流処置後のミクログリアおよびマクロファージの活性化における TRPM2 の関与を明らかにするため、ミノサイクリンによる神経保護作用について比較検討した。WT マウスではミノサイクリン投与群において神経症状が改善し、梗塞巣体積の増大が抑制されたが、TRPM2-KO マウスではミノサイクリン投与による保護作用が

全く観察されなかった。この結果より、ミクログリアおよびマクロファージに発現する TRPM2 が、神経傷害や梗塞巣の形成に関与することが示唆される。続いて、常在性ミクログリアと末梢血より浸潤するマクロファージのどちらが脳虚血傷害に対して寄与するのか明らかにするために、GFP 陽性 WT マウスあるいは GFP 陽性 TRPM2-KO マウス由来の骨髄由来細胞を骨髄破壊したマウスに移植し、骨髄キメラマウスを作製し検討に用いた。脳虚血 72 時間後の神経症状を評価したところ、中枢神経系および末梢骨髄由来細胞の双方に TRPM2 を発現しているキメラマウスに比べ、中枢神経系および骨髄由来細胞の双方で TRPM2 を欠損したキメラマウスは神経症状が有意に改善した。また末梢骨髄由来細胞でのみ TRPM2 を欠損させたキメラマウスや中枢神経系でのみ TRPM2 を欠損したキメラマウスにおいても神経症状が有意に改善した。この結果より、脳常在性の細胞および骨髄由来細胞の双方に発現する TRPM2 が神経障害の増悪に関与することが示唆される。

第一章において、脳虚血 24 時間後では神経症状や梗塞巣形成に変化が無く、脳虚血 48 時間および 72 時間後においては WT マウスで観察された脳虚血傷害の増悪が TRPM2 欠損により有意に抑制されていた。一方梗塞巣周囲の Iba1 陽性細胞数は脳虚血 24 時間後では同程度であったが、脳虚血 48 時間および 72 時間後においては、WT マウスで観察された Iba1 陽性細胞数の増大が TRPM2-KO マウスでは顕著に抑制されていた。この結果は日数の経過とともに病態が増悪するという脳内炎症仮説に沿う結果であり、TRPM2 欠損により炎症応答が抑制されることにより最終的な保護作用が観察されたのではないかと推測できる。また、WT マウスではミノサイクリン投与による寛解作用が観察されたのに対して、TRPM2-KO マウスではそれ以上の緩解作用は観察されなかった。梗塞巣周囲におけるミクログリア／マクロファージは、細胞傷害性因子やケモカイン／サイトカインなどの炎症促進性因子を産生し脳内炎症を増悪させるという報告を考慮すると、ミクログリアまたはマクロファージに発現する TRPM2 の欠損が、TRPM2 欠損マウスにおける寛解作用において重要であると考えられる。ミノサイクリンや Iba1 の免疫組織化学ではミクログリアとマクロファージの判別が困難であるため、骨髄キメラマウスを用いて検討を行ったところ、中枢神経系および骨髄由来細胞のどちらか片方の TRPM2 が欠損することで神経症状が改善した。この結果から、ミクログリア及びマクロファージの双方に発現する TRPM2 が脳虚血傷害の増悪に複合的に加担することが示唆される。

以上、本章において著者は、TRPM2 による脳虚血傷害の病態形成過程では、ミクログリアおよびマクロファージの双方に発現する TRPM2 が関与することを明らかにした。

### 第三章 ミクログリア／マクロファージに発現する

#### TRPM2 を介した脳虚血傷害の増悪機構の解明

第二章において著者は、脳虚血の亜急性期に集積が認められるミクログリアおよびマクロファージの双方に発現する TRPM2 が脳虚血傷害の形成に関与することを明らかにした。そこで第三章では、ミクログリア／マクロファージに発現する TRPM2 がどのような機序により脳虚血傷害を増悪させるか検討した。近年、脳虚血傷害時に組織傷害に伴い細胞外へと漏出される細胞障害関連分子パターン (damage-associated molecular pattern molecules: DAMPs) の一部が Toll like receptor (TLR) 4 や TLR2 の内因性リガンドとしてミクログリアおよびマクロファージなどの免疫細胞に作用し、惹起される炎症応答が遅発性神経傷害を増悪させることが示唆されているが、神経傷害を増悪させるメカニズムやその機能制御につながる標的分子はほとんど解明されていない。著者の所属する研究室では以前、TRPM2 欠損ミクログリアでは、LPS/IFN $\gamma$  刺激後の誘導型一酸化窒素合成酵素 iNOS mRNA 発現量増大や NO 遊離が抑制されていることを報告している。脳虚血傷害後には、ミクログリア／マクロファージにおいて iNOS が de novo 合成され、iNOS の薬理的阻害薬は脳虚血傷害に対して神経保護作用を示すことや、iNOS の遺伝子欠損マウスでは脳虚血傷害が改善することが報告されており、iNOS により過剰産生される NO が酸化的ストレスや DNA 損傷などを介して細胞傷害的に働くことが示唆されている。

そこで本章において著者は、一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおいても、TRPM2 が iNOS 発現誘導に関与するのか定量的 RT-PCR および免疫組織化学的手法を用いて明らかにした。続いて、iNOS の選択的阻害薬である 1400W を用いて、TRPM2 による脳虚血傷害の増悪機構として iNOS が関与するのか検討した。さらに、培養ミクログリアおよび培養マクロファージを用いて、TLR4 および TLR2 アゴニストによる活性化刺激後の NO 遊離に対する TRPM2 の関与を検討した。

はじめに、梗塞巣周囲における iNOS mRNA 発現量を定量的 RT-PCR を用いて検討したところ、WT マウスと比較して TRPM2-KO マウスでは脳虚血 72 時間後での iNOS mRNA 発現量の上昇が有意に抑制されていた。続いて iNOS の選択的阻害薬 1400W の作用を検討したところ、WT マウスでは 1400W 投与群において有意な神経症状の改善と梗塞巣体積の縮小が認められたが、TRPM2-KO マウスでは Vehicle 投与群と比較して 1400W 投与群は神経症状や梗塞巣体積に有意な差はなかった。この結果より、TRPM2 を介した iNOS の発現が、神経障害や梗

塞巢の形成に関与することが示唆される。続いて、梗塞巣周囲の iNOS の局在と発現量を iNOS の免疫組織化学により検討したところ、梗塞巣周囲の iNOS は Iba1 陽性細胞と共局在し、iNOS の蛍光強度は WT マウスに比較して TRPM2-KO マウスでは有意に低下していた。これらの結果より、TRPM2 遺伝子欠損により梗塞巣周囲のミクログリア／マクロファージの iNOS 発現量増大が抑制されていることが示唆される。最後に、ミクログリア／マクロファージに発現する TRPM2 が直接的に NO の過剰産生に関与しているのか検討するために、TLR4 アゴニストとして lipopolysaccharide (LPS) を、TLR2 アゴニストとして lipoteichoic acid (LTA) を用いて活性化刺激後の上清の NO 蓄積量を測定した。はじめに、培養ミクログリアおよび培養マクロファージにおいて LPS/IFN $\gamma$  および LTA/IFN $\gamma$  活性化刺激 48 時間後の TRPM2 mRNA 発現量が有意に増大していることを定量的 RT-PCR により確認した。さらに、培養ミクログリアにおいて LPS/IFN $\gamma$  および LTA/IFN $\gamma$  活性化刺激後の NO 産生が TRPM2 欠損ミクログリアで顕著に抑制された。同様に、培養マクロファージにおいて、LPS/IFN $\gamma$  および LTA/IFN $\gamma$  活性化刺激後の NO 産生が TRPM2 欠損マクロファージで顕著に抑制された。この結果より、ミクログリア／マクロファージにおいて iNOS を介した NO 産生が TRPM2 による脳虚血傷害の増悪に関与することが示唆される。

著者の所属する研究室では、ミクログリアにおける TLR4 刺激の下流において NADPH oxidase (NOX) が活性化し、その結果 NOX を介して産生される過酸化水素が TRPM2 を開口し、Ca<sup>2+</sup>感受性キナーゼである Pyk2 の活性化およびその後の JNK、p38 の活性化を介して遺伝子発現が上昇し、iNOS 発現および NO 過剰産生に至ることを明らかにした。このような経路がミクログリア／マクロファージの TLR2/TLR4 活性化刺激の下流で iNOS が発現する過程に共通して存在しているのではないかと強く推認する。一方 TLR2/TLR4 刺激の下流では、PKA や PKC の活性化を介した CD38 の活性化や、PARP1 の活性化も報告されており、CD38 や PARP1 の活性化により、TRPM2 の内因性アゴニストである ADPR が産生されることから、TRPM2 活性化の上流でこれらの分子が活性化していることが十分想定できる。

以上、著者は、TRPM2 が脳虚血の亜急性期において脳虚血傷害の病態を増悪させることを明らかにし、その機序として脳虚血後のミクログリア／マクロファージに発現する TRPM2 を介した NO の過剰産生が関与することを示した。本研究の成果は、TRPM2 がミクログリア／マクロファージによる過剰な炎症応答に重要な役割を果たすことを示唆するものであり、脳虚血傷害に伴う遅発性神経傷害の新たな治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。